



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08187095 A**(43) Date of publication of application: **23.07.96**

(51) Int. Cl.

**C12Q 1/26****C12N 9/96**(21) Application number: **07001835**(22) Date of filing: **10.01.95**(71) Applicant: **TOYOBO CO LTD**(72) Inventor:  
**HARADA NAOKO**  
**NISHIYA YOSHIKI**  
**YAMAMOTO KAZUMI**  
**TEJIMA SHINICHI**  
**AISUI SHIGENORI****(54) STABILIZING METHOD OF CHOLESTEROL  
OXIDASE****(57) Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain the stable enzyme without lowering the activity in preservation for a long time, without causing turbidity, useful as a reagent for measurement of cholesterol, etc., by adding a bovine serum albumin and a sugar or an amino acid to a solution containing cholesterol oxidase.

**CONSTITUTION:** A solution containing cholesterol oxidase is added with (A) 0.1-20% bovine serum albumin and (B) 0.1-20% at least one kind of sugar such as sucrose, glucose, trehalose, lactose, sodium gluconate and mannitol and/or 0.1-20% at least one kind of amino acid such as sodium glutamate, lysine and glycine, and

freeze-dried to obtain a stabilized cholesterol oxidase preparation. The preparation does not lower cholesterol oxidase activity in preserving for a long period of time, nor produces the turbidity and is used as a reagent for measurement, etc., of cholesterol useful as an indicator of diagnosis of or endocrinopathy dysbolism.

**COPYRIGHT: (C)1996,JPO**

**(54) PREPARATION OF 5'-GUANYLIC ACID**

(11) 60-224498 (A) (43) 8.11.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 59-78673 (22) 20.4.1984  
 (71) KYOWA HAKKO KOGYO K.K. (72) TATSUROU FUJIO(2)  
 (51) Int. Cl. C12P19/32, C12N15/00

**PURPOSE:** To prepare 5'-guanylic acid from 5'-xanthylic acid and ammonia, by using a transformed strain of *Escherichia coli* containing guanylic acid synthetase gene.

**CONSTITUTION:** *Escherichia coli* capable of producing 5'-guanylic acid from 5'-xanthylic acid and ammonia and/or L-glutamin, capable of converting adenosine phosphate into adenosine triphosphate by the use of an energy donor except phosphorus oxide to give 5'-guanylic acid. The above-mentioned *Escherichia coli* is given as a transformed strain. For example, a fragment of DNA containing guanylic acid synthetase gene is inserted into a tetracycline resistance site of plasmid pBR322, tryptophan promoter is connected to the upper stream of the gene to give plasmid (p×A10). K294 strain is transformed with the plasmid to give *E.coli* K294. *E.coli* K294 and/or p×A10 strain may be cited as the *Escherichia coli*.

**(54) STABLE PHARMACEUTICAL PREPARATION OF URICASE**

(11) 60-224499 (A) (43) 8.11.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 59-82630 (22) 23.4.1984  
 (71) TOYO BOSEKI K.K. (72) YUUZOU HAYASHI  
 (51) Int. Cl. C12Q1/34//C12Q1/62

**PURPOSE:** In pharmaceutical preparation of uricase containing uricase in a stable state, to obtain pharmaceutical preparation for diagnosis having high reliability, by adding a nonionic surface active agent, serum albumin and/or a basic amino acid to uricase.

**CONSTITUTION:** Uricase is dissolved in a proper buffer solution to give a uricase solution, which is blended with a stabilizer consisting of a nonionic surface active agent, serum albumin and/or a basic amino acid. They are stirred by a conventional procedure, and the mixed solution is dried by lyophilization, spray drying, etc. to give a product.

**(54) METHOD OF WITHERING OF UNNECESSARY TREE**

(11) 60-224601 (A) (43) 9.11.1985 (19) JP  
 (21) Appl. No. 59-80282 (22) 23.4.1984  
 (71) DAU CHEMICAL NIPPON K.K. (72) HIROHIKO HAMAGUCHI(2)  
 (51) Int. Cl. A01N25/00

**PURPOSE:** To wither unnecessary trees, by thrusting thick paper pieces impregnated with a substance having plant withering activity such as a picloram herbicide compound, etc. into space between the unnecessary trees and/or cut ends made by hatchets on main roots.

**CONSTITUTION:** In withering unnecessary trees in order to grow soundly useful trees in an artificial afforested land, a carrier (e.g., paper, cloth, plastic) impregnated with a substance having plant withering activity (e.g., 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid) is thrust into space between the unnecessary trees and/or cut ends by hatchets made on main roots to wither them. The cut ends mean cuts made by edged tools, and preferably they reach growing layers. Properly the cuts are made at height about 20~150cm above the ground, and are made at two or more parts depending upon the size of the unnecessary trees and chemical sensitivity. An amount of the herbicide used is 10~50mg per unnecessary tree.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-187095

(43) 公開日 平成8年(1996)7月23日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/26		6807-4B		
C 1 2 N 9/96				

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号	特願平7-1835	(71) 出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22) 出願日	平成7年(1995)1月10日	(72) 発明者	原田 尚子 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	西矢 芳昭 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内
		(72) 発明者	山本 和巳 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コレステロールオキシダーゼの安定化法

(57) 【要約】

【目的】 長期保存によってもコレステロールオキシダーゼ活性が低下せず、かつ、濁りが生じない安定なコレステロールオキシダーゼ製剤を提供する。

【構成】 コレステロールオキシダーゼを含む溶液に、  
(1) 牛血清アルブミンと(2) 糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物、またはリジンを添加し、凍結乾燥することを特徴とするコレステロールオキシダーゼの安定化法および得られた固形製剤ならびに該製剤を使用するコレステロール測定用試薬キット。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コレステロールオキシダーゼを含む溶液に、(1) 牛血清アルブミンおよび(2) 糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物を添加することを特徴とするコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項2】 コレステロールオキシダーゼを含む溶液に、(1) 牛血清アルブミンおよび(2) 糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物を添加し、さらに凍結乾燥する請求項1記載のコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項3】 糖類がシュクロース、グルコース、トレハロース、ラクトース、グルコン酸ナトリウムおよびマンニトールからなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物である請求項1記載のコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項4】 アミノ酸がグルタミン酸ナトリウム、リジンおよびグリシンからなる群から選ばれた少なくとも1種のアミノ酸である請求項1記載のコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項5】 糖類がシュクロース、グルコース、トレハロース、ラクトース、グルコン酸ナトリウムおよびマンニトールからなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物であり、アミノ酸がグルタミン酸ナトリウム、リジンおよびグリシンからなる群から選ばれた少なくとも1種のアミノ酸である請求項1記載のコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項6】 コレステロールオキシダーゼ溶液に対して、牛血清アルブミンを0.1～20%および糖類を0.1～20%および/またはアミノ酸を0.1～20%添加する請求項1記載のコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項7】 コレステロールオキシダーゼ、(1) 牛血清アルブミンおよび(2) 糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物を含有することを特徴とするコレステロールオキシダーゼ製剤。

【請求項8】 固形製剤である請求項7記載のコレステロールオキシダーゼ製剤。

【請求項9】 糖類がシュクロース、グルコース、トレハロース、ラクトース、グルコン酸ナトリウムおよびマンニトールからなる群から選ばれた少なくとも1種の化合物である請求項7記載のコレステロールオキシダーゼ製剤。

【請求項10】 アミノ酸がグルタミン酸ナトリウム、リジンおよびグリシンからなる群から選ばれた少なくとも1種のアミノ酸である請求項7記載のコレステロールオキシダーゼ製剤。

【請求項11】 糖類がシュクロース、グルコース、トレハロース、ラクトース、グルコン酸ナトリウムおよびマンニトールからなる群から選ばれた少なくとも1種

の化合物であり、アミノ酸がグルタミン酸ナトリウム、リジンおよびグリシンからなる群から選ばれた少なくとも1種のアミノ酸である請求項7記載のコレステロールオキシダーゼ製剤。

【請求項12】 コレステロールエステラーゼ製剤、(1) 牛血清アルブミンおよび(2) 糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物を含有するコレステロールオキシダーゼ製剤、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンおよびアニリン誘導体またはフェノール誘導体および緩衝液からなるコレステロール測定用試薬キット。

【請求項13】 コレステロールオキシダーゼを含む溶液に、リジンを添加することを特徴とするコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項14】 コレステロールオキシダーゼを含む溶液に、リジンを添加し、さらに凍結乾燥する請求項13記載のコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項15】 コレステロールオキシダーゼを含む溶液に、リジンおよび牛血清アルブミンを添加し、さらに凍結乾燥する請求項13記載のコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項16】 コレステロールオキシダーゼ溶液に対して、リジンを0.1～20%添加する請求項13記載のコレステロールオキシダーゼの安定化法。

【請求項17】 コレステロールオキシダーゼおよびリジンを含有することを特徴とするコレステロールオキシダーゼ製剤。

【請求項18】 コレステロールオキシダーゼ、リジンおよび牛血清アルブミンを含有する請求項17記載のコレステロールオキシダーゼ製剤。

【請求項19】 固形製剤である請求項17記載のコレステロールオキシダーゼ製剤。

【請求項20】 コレステロールエステラーゼ製剤、コレステロールオキシダーゼおよびリジンを含有するコレステロールオキシダーゼ製剤、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンおよびアニリン誘導体またはフェノール誘導体および緩衝液からなるコレステロール測定用試薬キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、コレステロールオキシダーゼの安定化法に関し、特に臨床的に、内分泌疾患や代謝異常の診断の指標となっている体液中のコレステロールの測定等に用いられるコレステロールオキシダーゼの安定化法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 コレステロールオキシダーゼは、臨床的に、内分泌疾患や代謝異常の診断の指標となっている体液中のコレステロールの測定等に用いられる酵素である。従来からコレステロールオキシダーゼの安定化法と

しては、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩の添加（特公昭57-13272号公報）、牛血清アルブミン、デキストラン、ポリエチレングリコールの添加（特開平6-62846号公報）が知られている。しかし、これらの物質の添加では、安定化が充分ではなく、保存期間中に酵素剤の活性の低下ならびに濁りの生成などの問題点があった。特に濁りにおいては記載がなく根本的な解決がなされていなかった。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明はコレステロールオキシダーゼの安定化法に関し、その目的とするところは長期間の保存によっても酵素活性が低下しない、かつ、濁りが生じない安定な酵素剤を提供することにある。ここで言う安定化とは酵素活性の保持と変性などによる酵素剤からの濁り生成の抑制の2点を指す。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明はコレステロールオキシダーゼを含む溶液に、(1)牛血清アルブミンおよび(2)糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物を添加することを特徴とするコレステロールオキシダーゼの安定化法である。

【0005】また本発明はコレステロールオキシダーゼ、(1)牛血清アルブミンおよび(2)糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物を含有することを特徴とするコレステロールオキシダーゼ製剤である。

【0006】さらに本発明はコレステロールエステラーゼ製剤、(1)牛血清アルブミンおよび(2)糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物を含有するコレステロールオキシダーゼ製剤、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンおよびアニリン誘導体またはフェノール誘導体および緩衝液からなるコレステロール測定用試薬キットである。

【0007】また本発明はコレステロールオキシダーゼを含む溶液に、リジンを添加することを特徴とするコレステロールオキシダーゼの安定化法である。

【0008】また本発明は、コレステロールオキシダーゼおよびリジンを含有することを特徴とするコレステロールオキシダーゼ製剤である。

【0009】さらに本発明はコレステロールエステラーゼ製剤、コレステロールオキシダーゼおよびリジンを含有するコレステロールオキシダーゼ製剤、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチピリンおよびアニリン誘導体またはフェノール誘導体および緩衝液からなるコレステロール測定用試薬キットである。

【0010】本発明に使用するコレステロールオキシダーゼとしては、如何なる起源のものでもよいが、例えばストレプトマイセス属、コリネバクテリウム属、プレバクテリウム属、ノカルディア属等の微生物により生産されるコレステロールオキシダーゼがある。これらの微

生物を培養して得られるコレステロールオキシダーゼ含有培養物、該培養物を常法により抽出して得た粗酵素、あるいは該粗酵素を常法により精製して得られる精製酵素等が好適に用いられる。さらにこれらの酵素を遺伝子工学的あるいは化学的、物理的に修飾して得られる酵素も含まれる。

【0011】本発明の安定化剤の配合法は、特に制限はない。例えばコレステロールオキシダーゼを含む緩衝液に安定化剤を配合する方法、安定化剤を含む緩衝液にコレステロールオキシダーゼを配合する方法、あるいはコレステロールオキシダーゼと安定化剤を緩衝液に同時に添加する方法等がある。本発明では安定化剤を配合した酵素溶液を凍結乾燥することが好ましい。凍結乾燥の条件は特に制限はない。

【0012】本発明に用いる緩衝液としては、リン酸緩衝液、グッドバッファー、その他生化学で用いられる緩衝液なら何れでもよいが、pHは4~10、望ましくはpH6.0~8.0である。

【0013】本発明に使用する牛血清アルブミン濃度は、コレステロールオキシダーゼ溶液に対して0.1%~20%である。しかし、牛血清アルブミン単独では、下記表1に示すように37℃一週間保存で88%の残存活性しかなく、十分な安定化効果が得られなかった。また、濁りの形成においても著しいものであった。

【0014】本発明に使用する糖類としては、グルコース、ガラクトース、キシロース、フラクトース等の単糖類、ラクトース、マルトース等の二糖類、トレハロース、シュクロース、グルコン酸等の多糖類があるが、特にシュクロース、グルコース、トレハロース、ラクトース、グルコン酸ナトリウム、マンニトールが好ましい。また、その濃度としては、コレステロールオキシダーゼ溶液に対して0.1~20%である。糖類単独では、下記表1に示すように37℃一週間保存で、十分な安定化効果が得られず、また濁りの形成においても著しいものであった。糖類は1種または2種以上を組み合わせ使用してもよい。

【0015】本発明に使用するアミノ酸もしくはその塩としてはグリシン、グルタミン酸、リジン等の親水性のアミノ酸もしくはそのナトリウム、カリウム、アンモニウム等の塩、酢酸塩または塩酸塩等があるが、特にグリシンアミノ酢酸塩、リジン塩酸塩が好ましい。その濃度としては、コレステロールオキシダーゼ溶液に対して0.1~20%である。リジン以外のアミノ酸単独では、下記表1に示すように37℃一週間保存で、十分な安定化効果が得られず、また濁りの形成においても著しいものであった。リジンは単独にても安定化効果および濁り形成において優れている。アミノ酸は1種または2種以上を組み合わせ使用してもよい。

【0016】本発明の好ましい実施態様は、コレステロールオキシダーゼを含む溶液に、(1)牛血清アルブミン

および(2) 糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物を添加し、さらに凍結乾燥するコレステロールオキシダーゼの安定化法である。

【0017】本発明の別な好ましい実施態様は、コレステロールオキシダーゼを含む溶液に、リジンを添加し、さらに凍結乾燥するコレステロールオキシダーゼの安定化法である。

【0018】また、本発明の別な好ましい実施態様は、コレステロールオキシダーゼ、(1)牛血清アルブミンおよび(2) 糖類およびアミノ酸からなる群から選択された少なくとも1種の化合物を含有するコレステロールオキシダーゼ固形製剤である。

【0019】さらに本発明の別な好ましい実施態様は、コレステロールオキシダーゼ、リジンを含有するコレステロールオキシダーゼ固形製剤である。

【0020】本発明のコレステロール測定用試薬キットは、コレステロールオキシダーゼの作用により生成した過酸化水素を公知の種々の方法で測定するものであるが、最も一般的に利用されている方法は、ペルオキシダーゼの存在下、色原体を酸化し、4-アミノアンチピリンなどのカップラーと縮合させて色素を形成させ、比色定量する方法が挙げられる。この方法に用いられる色原体としては、フェノール、2-クロロフェノール、4-クロロフェノール、2, 4-ジクロロフェノールなどのフェノール誘導体、もしくはアニリン、N, N-ジメチルアニリン、N, N-ジエチルアニリン、N, N-ジエチル-m-トルイジン、N, N-ジエチル-m-アニジン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-トルイジン、N-エチル-N-スルホプロピル-m-アニジンなどのアニリン誘導体が挙げられる。過酸化水素の測定試薬は上記試薬に限られない。

#### 【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明する。

#### 実施例1

コレステロールオキシダーゼ溶液(2,000U/ml) 1ml に、牛血清アルブミン(以下BSA と略す。オルガノテクニカ製)を17.2mgとシュクロース、グルコース、トレハロース、ラクトース、グルコン酸Na、マンニトール、グルタミン酸Na、グリシンからなる群から選ばれた一種を、それぞれ14.7mg添加混合し、凍結乾燥を行い、凍結乾燥粉末を50mg得た。また同様に、それぞれの添加剤のみ単独を添加し、または添加せずに、凍結乾燥粉末を得た。

【0022】上記製法で得た牛血清アルブミンと糖類またはアミノ酸を添加したコレステロールオキシダーゼ凍

結乾燥粉末、コレステロールオキシダーゼ溶液にBSA 17.2mgのみを添加し凍結乾燥した粉末、糖類またはアミノ酸のみを14.7mg添加し、凍結乾燥した粉末ならびに添加剤なしのコレステロールオキシダーゼ凍結乾燥粉末を以下のように比較した。凍結乾燥粉末を37℃にて一週間保存し、その後の残存活性を測定した。また、該粉末を保存後、過剰テストとして、該粉末を100U/ml になるように、50mM PIPESバッファー(pH7.0) に溶解し、その溶液を37℃に保持し、濁りの生成をOD<sub>660</sub>で測定し、かつ目視により濁りを確認した。その結果を表1 および表2に示す。

#### 【0023】

【表1】

添加剤	残存活性(%)	OD <sub>660</sub>	目視濁り
なし	60.5	1.368	×
BSA	88.1	1.0	×
シュクロース	73.3	0.488	△
グルコース	91.4	0.236	△
トレハロース	74.3	0.44	△
ラクトース	81.8	0.384	△
グルコン酸Na	70.5	0.316	△
マンニトール	40.3	0.46	△
グルタミン酸Na	76.4	0.216	△
グリシン	66.0	1.08	×

#### 【0024】

【表2】

BSAと組み合わせ			
添加剤	残存活性(%)	OD <sub>660</sub>	目視濁り
シュクロース	88.6	0.136	○
グルコース	84.0	0.024	○
トレハロース	83.9	0.116	○
ラクトース	84.4	0.168	○
グルコン酸Na	87.7	0.096	○
マンニトール	67.9	0.116	○
グルタミン酸Na	78.9	0.164	○
グリシン	101.1	0.076	○

【0025】本発明の安定化されたコレステロールオキシダーゼ凍結乾燥粉末は、37℃で保存した場合、一週間にわたって十分な活性を維持すること、濁りの生成も実用レベルでほとんど問題に成らないレベルまで改善されたことを確認した。一方、無添加のコレステロールオキシダーゼ凍結乾燥粉末は、37℃、一週間保存で、活性が60%しか残存しておらず、著しい濁りの生成がみられた。また、BSA のみ添加した凍結乾燥粉末は、残存活性が88%であったが、著しい濁りの生成がみられた。

#### 【0026】実施例2

コレステロールオキシダーゼ溶液(2,000U/ml) 1ml に、リジンを14.7mg添加混合し、凍結乾燥を行い、凍結乾燥粉末を50mg得た。また、同様にコレステロールオキ

10

20

30

40

50

シダーゼ溶液(2,000U/ml) 1ml に、BSAを17.2mgとリジン14.7mg添加混合し、凍結乾燥を行い、凍結乾燥粉末を50mg得た。これらの凍結乾燥粉末を37℃にて一週間保存し、その後の残存活性を測定した。また、該粉末を保存後、過剰テストとして、該粉末を100U/ml になるように、50mM PIPESバッファー(pH7.0) に溶解し、その溶液を37℃に保持し、濁りの生成をOD<sub>660</sub>で測定し、かつ目視により濁りを確認した。その結果を表3に示す。

【0027】

【表3】

添加剤	残存活性(%)	OD <sub>660</sub>	目視濁り
リジン	102.2	0.072	○
リジン + BSA	101.9	0.008	◎

## 【0028】実施例3

コレステロールオキシダーゼ溶液(2,000U/ml) 1ml に、BSA (オルガノテクニカ製) 21.2mgと、リジン16.8mg (リジン1) または33.6mg (リジン2) を添加混合し、凍結乾燥を行い、凍結乾燥粉末を得た。得られたコレステロールオキシダーゼ凍結乾燥粉末を37℃にて二週間保存し、その後の残存活性を測定した。また、粉末を保存後、100U/ml になるように50mM PIPESバッファー(pH7.0) に溶解し、その溶液を37℃に保持し、濁りの生成をOD<sub>660</sub>で測定した。その結果を表4に示す。

【0029】

【表4】

添加剤	残存活性(%)	OD <sub>660</sub>	濁り
リジン1	98.2	0.022	◎
リジン2	100	0.010	◎

【0030】本発明により安定化されたコレステロールオキシダーゼは、37℃で保存した場合、二週間にわたって十分な活性を維持すること、濁りの生成も実用レベルでほとんど問題に成らないレベルまで改善されたことを確認した。

## 【0031】実施例4

コレステロールオキシダーゼ溶液(2,000U/ml) 1ml に、BSA18.6mgおよびリジン14.8mgまたはシュークロース14.8mgを添加混合し、さらに BSA 18.6mg およびリジンおよびシュークロースをそれぞれ14.8mg添加混合し、凍結乾燥を行い、凍結乾燥粉末を得た。

【0032】得られたコレステロールオキシダーゼ凍結乾燥粉末を37℃にて一週間保存し、その後の残存活性を測定した。また、該粉末を保存後、100U/ml になるよう \*

\*に50mM PIPESバッファー(pH7.0) に溶解し、その溶液を37℃に保持し、濁りの生成をOD<sub>660</sub>で測定した。その結果を表5に示す。

【0033】

【表5】

添加剤	残存活性(%)	OD <sub>660</sub>	濁り
BSA + リジン	92.9	0.011	◎
BSA + シュークロース	89.4	0.153	○
BSA + リジン + シュークロース	98.3	0.074	○

【0034】本発明により安定化されたコレステロールオキシダーゼは、37℃で保存した場合、一週間にわたって十分な活性を維持すること、濁りの生成も実用レベルでほとんど問題に成らないレベルまで改善されたことを確認した。

## 【0035】比較例1

コレステロールオキシダーゼ溶液(2,000U/ml) 1ml に、塩化ナトリウムをそれぞれ29mg (0.5M)、17.5mg (0.3M)、8.8mg (0.15M) 添加混合し、凍結乾燥を行い、凍結乾燥粉末を得た。得られた凍結乾燥粉末を37℃にて二週間保存し、その後の残存活性を測定した。また、粉末を保存後、100U/ml になるように50mM PIPESバッファー(pH7.0) に溶解し、その溶液を37℃に保持し、濁りの生成を目視判定した。その結果を表6に示す。

【0036】

【表6】

添加剤	残存活性(%)	濁り
0.5M NaCl	88.4	×
0.3M NaCl	80.1	×
0.15M NaCl	100	×

このように、アルカリ金属では濁りの生成が著しい。

【0037】

【発明の効果】本発明ではリジンを添加することにより、安定化効果とともに濁りに関して優れたコレステロールオキシダーゼ製剤を得ることができる。また、従来から、牛血清アルブミン、糖類、アミノ酸は各種酵素の安定化剤として知られているが、本発明ではそれらを組み合わせることにより、単独で用いる場合よりも熱に対して、一段と優れた安定化効果が見られる。さらに本発明では、その組み合わせにより、濁りの生成を抑える効果が非常に高く、安定な酵素製剤を得ることが出来る。したがって、生化学試薬等として、前処理なしに使用できる利点を有する。

フロントページの続き

(72)発明者 手嶋 真一  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 愛水 重典  
福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株  
式会社敦賀バイオ研究所内